

ヒトT細胞白血病ウイルスI型 (HTLV-I) Tax タンパクの構造と転写活性化機構の解析

金沢大学医学部内科学第三講座 (主任: 松田 保教授)

土 屋 晴 生

(平成3年7月16日受付)

ヒトT細胞白血病ウイルスI型 (human T-cell leukemia virus type-I, HTLV-I) 遺伝子の pX 領域にコードされる Tax タンパクは、HTLV-I 遺伝子の発現を転写レベルで活性化する。この際、末端繰り返し配列 (long terminal repeat, LTR) 内に存在する21塩基対の繰り返し配列が Tax タンパク依存性のエンハンサーとして機能する。現在まで Tax タンパクとウイルスエンハンサーとの結合は検出されておらず、Tax タンパクによる転写の活性化機構は明らかにされていない。本研究では、Tax タンパクと異種の転写因子である酵母 GAL4 タンパクの DNA 結合領域との融合タンパク (GALTax) を作製し、この融合タンパクが GAL4 タンパク結合配列に依存して転写を活性化しうること、すなわち Tax タンパクが転写活性化領域を持つ事を示した。次に GALTax の Tax タンパクの部分に種々の欠失変異を導入したところ、GAL4 タンパク結合配列に依存した転写活性化には、Tax タンパクのほぼ全領域 (アミノ酸2番-337番) が必要であった。またこれらの欠失変異体の GAL4 タンパク結合配列依存性の転写活性化能と、ウイルスエンハンサー依存性の転写活性化能とは良く相関した。一方で、C末端から41アミノ酸を欠失し、ウイルスエンハンサー依存性の転写活性化能を失った変異体、GALTax (2-312) は異種の転写因子であるヘルペスウイルスの VP16 タンパクの転写活性化領域と融合する事によって、ウイルスエンハンサーに依存した転写活性化能を回復する。すなわちこの変異体は、転写活性化能を失ってもウイルスエンハンサーに対する特異性を保持していることが明らかになった。以上の結果から Tax タンパクが、重複しているけれども独立して機能し得る二つの機能領域、転写活性化領域とエンハンサーに対する特異性を規定する領域とを持つことが示された。これより Tax タンパクは、エンハンサーに結合する以前の細胞性転写因子に作用する修飾酵素やアロステリックなエフェクターではなく、転写調節因子としてエンハンサー上で細胞性転写因子と複合体を形成して転写を活性化すると考えられる。

Key words HTLV-I, tax, transcription factor, activation domain, enhancer specificity

ヒトT細胞白血病ウイルスI型 (human T-cell leukemia virus type-I, HTLV-I) は、ヒトから単離された最初のレトロウイルスであり、九州南西部およびカリブ海沿岸に集中的に発生する成人T細胞白血病 (adult T cell leukemia, ATL) の原因ウイルスであ

る¹⁻³⁾。HTLV-Iはほかの動物レトロウイルスに見られるような細胞性癌遺伝子に由来する典型的なガン遺伝子をもっていない⁴⁾。さらに HTLV-I の白血病細胞への組込み部位は ATL 患者間で共通性がないことから HTLV-I が白血病細胞へ組込まれることにより細胞側

Abbreviations: ATF, activating transcription factor; ATL, adult T cell leukemia; cAMP cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate; BLV, bovine leukemia virus; CAT, chloramphenicol acetyl transferase; DMEM, Dulbecco modified Eagle's medium; EDTA, ethylene-diamine-tetr-

の特定のガン遺伝子が活性化されるということが ATL の発症に関与しているとは考えにくい⁹⁾。したがってウイルスの組み込み部位とは無関係に特定の遺伝子を誘導できる因子、つまりトランスに作用できるウイルス性因子が想定されるに至った。

自己増殖可能な動物レトロウイルスは gag, pol, env の3つの遺伝子をウイルスゲノム中にもつが、HTLV-I はこれらの遺伝子に加えて pX と呼ばれる特異な領域を env 下流にもっており⁹⁾、この領域には40 キロダルトン (kilodalton, kd), 27kd および 21kd の3つのタンパクがコードされている。このうち 40kd の Tax タンパクは、自らの末端繰り返し配列 (long terminal repeat, LTR) 内にある21塩基対の繰り返し配列に依存してウイルス遺伝子の発現を転写レベルで増大させる⁹⁻¹⁰⁾。また Tax タンパクは感染T細胞の増殖を制御するインターロイキン-2 (interleukin-2, IL-2) 遺伝子, IL-2 レセプター α サブユニット (IL-2 receptor α subunit, IL-2R α) 遺伝子の発現異常を誘導する^{10,11)}。その場合、Tax タンパクはこれらの遺伝子のの上流にある κ B配列への nuclear factor κ B (NF- κ B) 結合活性を誘導することが知られている¹²⁾。Tax タンパクはこの他にも c-fos 遺伝子¹³⁾、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子 (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF)、インターロイキン-3 (interleukin-3, IL-3)¹⁴⁾などの細胞増殖に関与する種々の細胞遺伝子の転写を活性化し、一方で DNA 修復に関与する β -ポリメラーゼ遺伝子の転写を抑制するはたらきも持っている¹⁵⁾。これら複数の遺伝子の発現異常が ATL 発症に関与すると考えられている。

Tax タンパクによる HTLV-I エンハンサー依存性の転写活性化には、新たなタンパク合成が不要であることが報告されている¹⁶⁾。従って Tax タンパクは、ウイルスエンハンサーに作用する細胞性転写因子を誘導するのではなく、HTLV-I エンハンサーに直接作用すると考えられている。しかし Tax タンパクが DNA へ、直接もしくは他のタンパクを介して間接的に結合する活性は検出されておらず、どのようにして Tax タンパクがこれらの遺伝子発現を調節しているのかはいまだに解明されていない。

Tax タンパクによる転写調節機構としては次の二つの機構が考えられる。第一の機構は、Tax タンパクが細胞性の転写調節因子と、通常の生化学的手法では

検出不能な親和性の低い複合体を形成して、HTLV-I エンハンサーに結合し転写を活性化する場合である。細胞性の転写調節因子と複合体を形成して転写を活性化する機構を持つタンパクとして、次に示すものが報告されている。ヘルペスウイルスの VP-16 タンパクは細胞性転写因子 Oct-1 タンパクと結合し、Oct-1 タンパクの結合するオクタマー配列に依存して転写を活性化する^{17,18)}。またアデノウイルスの E1A タンパクは Activating transcription factor (ATF) タンパクと結合し、ATF タンパクの結合する DNA 配列依存性の転写活性化能を持つと考えられている¹⁹⁾。第二の機構は、Tax タンパクがエンハンサーに結合する以前の細胞性転写因子に作用してその機能を修飾する場合である。第二の機構を介して作用する事が示唆されているタンパクとしてはB型肝炎ウイルスのXタンパクが知られている。Xタンパクはセリン/スレオニン磷酸化酵素活性を持ち、この酵素活性とXタンパクによる転写活性化能が相関することが知られている²⁰⁾。Tax タンパクによる転写調節機構をあきらかにするためには、Tax タンパクが上記のいずれの機構で HTLV-I 遺伝子の転写活性を調節しているのかをまず明らかにする必要がある。

転写に関与する DNA の領域は、プロモーターとエンハンサーからなる。転写開始位置周辺にあるプロモーターが、転写開始位置ならびにその基本量を規定する。一方で、エンハンサーは転写開始位置から離れたところにあつて、転写量の増減に関わっている。また転写因子側にも同様に基本因子と調節因子とがある。基本因子は複数存在し、順に転写開始位置付近に作用して安定な転写開始複合体を形成し、転写開始反応を引き起こす。一方転写調節因子は、エンハンサーに直接あるいは他のタンパクを介して間接的に結合し、転写の活性化、不活性化に関与する。DNA に直接結合する転写調節因子の例としては、酵母の転写調節因子である GAL4 タンパクがある^{21,22)}。GAL4 タンパクは DNA 結合領域および転写活性化領域を持ち、GAL4 タンパク結合配列依存性に転写を活性化する。一方 DNA に他のタンパクを介して結合する転写調節因子の例としては、先述のヘルペスウイルスの転写調節因子である VP16 タンパクが知られている。Sadowski らは、転写活性化領域を欠失し、DNA 結合領域のみを持つ酵母 GAL4 タンパクの欠失変異体と

acetic acid 2Na; FCS, fetal calf serum; GM-CSF, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; HBS, HEPES-buffered saline; HEPES, N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethane sulfonic acid; HTLV-I, human T-cell leukemia virus type-I; IL-2, interleukin-2; IL-3,

ヘルペスウイルスの VP16 タンパクの転写活性化領域との融合タンパクを遺伝子工学的に発現させて、この融合タンパクが GAL4 タンパク結合配列に依存して転写を活性化することを示した²⁰⁾。このように転写調節因子は、基本因子と相互作用して転写を活性化する転写活性化領域および、DNA に直接あるいは他のタンパクを介して結合することによりエンハンサーに対する特異性を決定する領域を持ち、またこれらの領域は互いに独立して機能する^{24)~26)}。Tax タンパクがいわゆる転写調節因子としてエンハンサー DNA に直接あるいは間接的に結合して作用するならば、転写活性化領域および、作用するエンハンサーに対する特異性を決定する領域を持つはずである。一方 Tax タンパクが転写因子の修飾酵素であったり、アロステリックなエフェクターである場合には、上記の機能領域を持つことはない。

本研究では Tax タンパクが、これらの独立して機能する二つの領域を持つかどうかを次の点について検討した。まず Tax タンパクが酵母 GAL4 タンパクの DNA 結合領域と協調的にはたらく転写活性化領域を持つかどうかを検討した。また GAL4 タンパクの DNA 結合領域と協調的に転写を活性化するために必要な Tax タンパクの領域を検討した。次に Tax タンパクによる HTLV-I エンハンサー依存性の転写活性化には、Tax タンパクの転写活性化領域が必要である

ことを確認した。さらに Tax タンパクが、異種の転写活性化領域と協調的にはたらく HTLV-I エンハンサーに対する特異性を規定している領域を持つかどうかを検討した。

対象および方法

I. 使用細胞

マウス線維芽細胞由来 NIH 3T3 細胞を10%牛胎児血清 (fetal calf serum, FCS) (Hyclone, Utah, USA) 加ダルベッコ変法イーグル培地 (Dulbecco modified Eagle's medium, DMEM) (日水, 東京) にて37°Cで培養した。

II. レポータープラスミドの構築 (図1)

レポータープラスミド p21aCAT, pG5BCAT, pBCAT は金沢大学がん研究所ウイルス部藤井雅寛博士から分与された。これらのレポータープラスミドは pSVoCAT²⁰⁾ をベクターとして作製されている。レポータープラスミド p21aCAT は、21塩基対を6回繰り返した DNA 配列を Tax タンパク依存性のエンハンサーとして持ち、この下流に、HTLV-I の LTR 領域中にある転写開始点より57塩基対上流から下流306塩基対の部位をプロモーターとして持っている。p21aCAT はこれらの二つの領域を pSVoCAT のクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (chloramphenicol acetyl transferase, CAT) 遺伝子の上

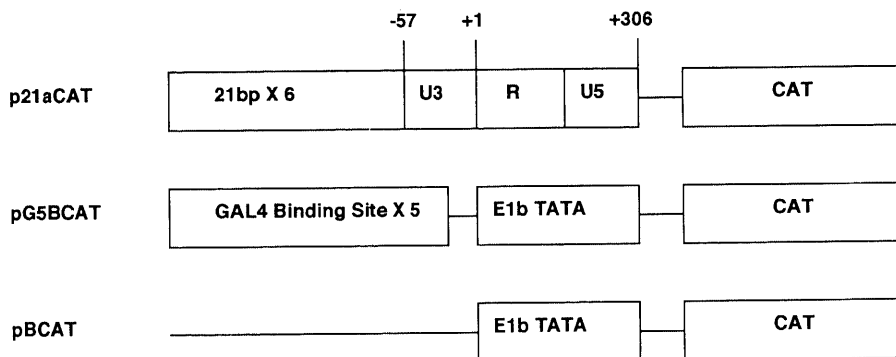


Fig. 1. Schematic representation of reporter plasmids. PSVoCAT was used as the vector of reporter plasmids. The reporter plasmid p21aCAT has the CAT gene containing -57 to 306 region of HTLV-I promoter with six upstream synthetic 21mer DNA. The reporter plasmid pG5BCAT or pBCAT has the CAT gene containing the E1b TATA either with or without five upstream GAL4 binding sites.

interleukin-3; kd, kilodalton; LTR, long terminal repeat; NF- κ B, nuclear factor κ B; PBS, phosphate buffered saline; SDS, sodium dodecyl sulfate; TE, Tris EDTA; TNE, Tris NaCl EDTA; TPA, 12-0-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate; Tris, Tris-hydroxymethyl-aminomethane

流に挿入し作製された。レポータープラスミド pBCAT はアデノウイルスの Elb 遺伝子の TATA box をプロモーターとして、この DNA 配列を pSVoCAT の CAT 遺伝子の上流に挿入したものである。レポータープラスミド pG5BCAT は GAL4 タンパクの結合する17塩基対を5回繰り返した DNA 配列を GAL4 タンパク依存性のエンハンサーとし、この領域を pBCAT のプロモーターの上流に挿入し作製された。

III. エフェクタープラスミドの構築

プラスミド pSG5 (東洋紡, 大阪) は, SV40 のプロモーターの支配下に、その下流にある遺伝子を真核細胞内で発現させる。このプラスミドをベクターとして下記のエフェクタープラスミドを作製した。

1. Tax タンパク発現プラスミド (図2)

Tax タンパク発現プラスミドは金沢大学がん研究所ウイルス部藤井雅寛博士から分与された。

2. GAL4 タンパクの DNA 結合領域と Tax タンパクまたはその欠失変異体との融合タンパク発現プラスミド (図2)

GAL4 タンパクのアミノ酸の1番から147番に存在する DNA 結合領域発現プラスミド GAL (1-147) および、この領域と Tax タンパクの C 末端側41アミノ酸の欠失変異体を融合した GALTax (2-312) プラスミドはがん研ウイルス部藤井雅寛博士から分与を受けた。GAL (1-147) プラスミドの中にある、GAL4 タンパクの DNA 結合領域をコードする遺伝子の3'側に読み取り枠を合わせて tax 遺伝子およびその欠失変異体を挿入した。すなわち Tax タンパク発現プラスミドを図2に示す制限酵素認識部位で切断後、アガロース

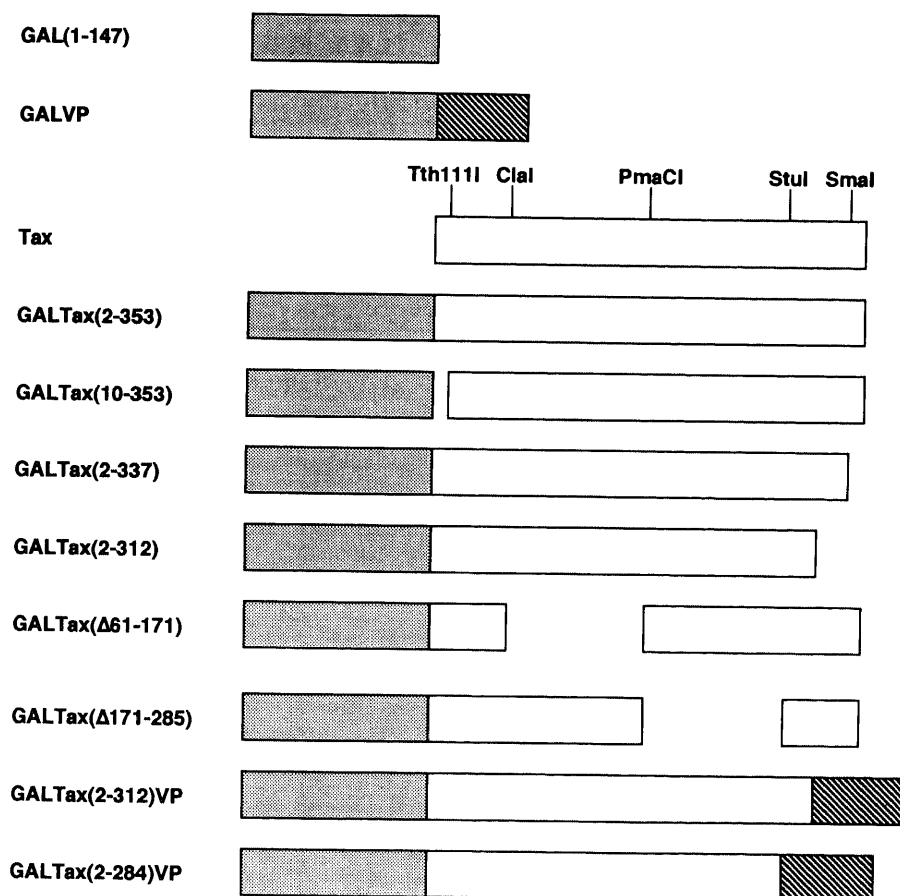


Fig. 2. Schematic representation of proteins encoded by effector plasmids. Dot boxes indicate GAL4 DNA binding domain (amino acid 1-147). Striped boxes indicate VP16 activation domain (amino acid 413-490). Restriction enzymes, TthIII, ClaI, PmaCI, StuI and SmaI were used to construct these hybrids.

(Sigma, St. Louis, USA) ゲル電気泳動にて、目的とする DNA 断片を分離し、DEAE ペーパーにて回収した。DEAE ペーパーを 100mM NaCl 溶液にて洗滌後、2M NaCl 溶液にて DNA 断片を溶出した。溶出液を等量のフェノールおよび CIAA (クロロホルムとイソアミルアルコールを 24:1 の割合で混合したもの) にて抽出後、エタノール沈澱を行った。

ベクタープラスミドは制限酵素にて切断後、再結合を防ぐためアルカリフォスファターゼ (宝酒造, 京都) にて、0.25M Tris-hydroxymethyl-aminomethane (Tris)-HCl pH 8.0 緩衝液中にて 56°C 1 時間処理し、断端を脱リン酸化後、フェノール抽出およびエタノール沈澱を行った。ベクター DNA および挿入遺伝子 DNA 各 150ng をライゲーションキット (宝酒造) A 液 8 μ l に B 液 1 μ l を使用して結合させた。

3. GAL4 タンパクの DNA 結合領域と VP16 タンパクの転写活性化領域との融合タンパク発現プラスミド (図 2)

GAL4 タンパクの DNA 結合領域と VP16 タンパクのアミノ酸の 413 番から 490 番に存在する転写活性化領域との融合タンパク発現プラスミドはがん研ウイルス部藤井雅寛博士から分与を受けた。

4. GAL4 タンパクの DNA 結合領域と Tax タンパクの欠失変異体と VP16 タンパクの転写活性化領域との融合タンパク発現プラスミド (図 2)

上記 3. のプラスミドの中にある GAL4 タンパクの DNA 結合領域をコードする遺伝子と VP16 タンパクの転写活性化領域をコードする遺伝子との間に読み取り枠を合わせて tax 遺伝子の欠失変異体を挿入した。

IV. プラスミドの大量調整

上記のようにして得られたプラスミドで形質転換した大腸菌 HB101 株を 2 \times YT 培地 [トリプトン (和光, 大阪) 16g, 酵母エキス (和光) 10g, NaCl 5g, アンピシリン (和光) 50mg/l, pH 7.6] 250ml にて 24 時間培養した。途中、培養開始から約 8 時間後に 34mg/ml クロラムフェニコール (和光) のエタノール溶液を各培養瓶あたり 1.25ml ずつ加えた。培養終了後、5,000rpm 10 分遠心により集菌した。

菌体を 10ml の 25% スクロース、50mM Tris-HCl 緩衝液 pH 7.5 に懸濁後、リゾチーム (和光) 10mg 加え、ゆるやかに混和した後 5 分水中に静置、0.25M エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム (ethylene-diamine-tetraacetic acid 2Na, EDTA) 1ml 加え 15 分水中に静置、0.3% triton, 0.2M EDTA, 0.15M NaCl 10ml 加え 15 分水中に静置した後、30,000rpm 40 分遠心した。上清に 5M NaCl 2.5ml, 10% ドデシル硫酸ナトリウム

(sodium dodecyl sulfate, SDS) 0.25ml, フェノール CIAA 25ml を加え、フェノール抽出およびエタノール沈澱を行った。沈澱を 3ml の Tris EDTA (TE) (10mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA pH 8.0) に溶解後 150 μ g のリボヌクレアーゼ (Sigma) を加え 37°C 30 分反応後、塩化セシウム (cesium chloride, CsCl) (BRL, Gaithersburg, USA) 4.2g, エチジウムブロマイド 4 μ g を加え、クイックシールチューブ (quick seal tube) (ベックマンジャパン, 東京) に注入密閉した。ベックマン VTi65 垂直ローター (ベックマンジャパン) にて 20°C, 60,000rpm 10 時間超遠心後、プラスミドのバンドを注射器で回収した。1.1g/ml CsCl, 0.54mg/ml エチジウムブロマイドを含む TE にて 5.2ml に希釈後、再び 20°C 65,000rpm 5 時間超遠心した。プラスミドのバンドを回収しフェノール抽出、エタノール沈澱後 TE にて 1mg/ml の濃度に溶解した。

V. 遺伝子導入

CAT アッセイに使用する NIH3T3 細胞は約 5.0×10^5 個/ml の濃度で 10% FCS 加 DMEM 4ml にて 37°C 24 時間培養後、リン酸カルシウム法にて遺伝子導入を行った。レポータープラスミド 6 μ g と、エフェクタープラスミド 0.5 μ g-3 μ g を、0.26M 塩化カルシウム 276 μ l に混合し、その混合液を 2 \times HEPES-buffered saline (2 \times HBS) [NaCl 280mM, N-2 hydroxyethyl-piperazine-N'-2-ethane sulfonic acid (HEPES) 緩衝液 pH 7.9 50mM, NaHPO₄ 2.8mM] 288 μ l に滴下しながら混合し、室温にて 20 分静置した後、NIH3T3 細胞に加えて 6 時間培養した。その後、10mM 磷酸緩衝生理食塩液 (phosphate buffered saline, PBS) 4ml で洗浄後 10% FCS 加 DMEM 4ml で 37°C 48 時間培養した。

VI. CAT アッセイ

遺伝子導入した細胞を PBS で洗滌し Tris NaCl EDTA (TNE) (Tris-HCl pH 8.0 40mM, NaCl 150mM, EDTA 1mM) 1ml にて回収、10,000rpm 10 秒遠心し沈澱に 0.25M Tris-HCl pH 8.0 を 150 μ l 加え、超音波ホモジナイザー MODEL UR-20P (トミー精工, 東京) にて最大出力で 8 秒間処理し細胞を破壊、続いて 10,000rpm 10 分遠心した後、上清 75 μ l に 1M Tris-HCl pH 7.5 15 μ l, 4mg/ml アセチル CoA (acetyl coenzymeA) (Sigma) 20 μ l, ¹⁴C-クロラムフェニコール (D-threo-[¹⁴C]chloramphenicol) (アマシャムジャパン, 東京) 0.25 μ l, 蒸留水 40 μ l を加えて 37°C 60 分インキュベートした。そして、酢酸エチル (半井, 京都) 500 μ l を加えて激しく混和し、10,000rpm 1 分遠心、酢酸エチル層を回収、真空乾燥

させた。これを $12\mu\text{l}$ の酢酸エチルにて溶解、シリカゲル薄層プレートにスポット後クロロホルム:メタノール19:1混合液を溶媒として展開を行った。CAT タンパクの酵素活性を測定するために、イメージアナライザーにて放射活性を定量し、アセチル化されたクロラムフェニコールとアセチル化されていないクロラムフェニコールとの放射活性の和を100%とした時の、アセチル化されたクロラムフェニコールの放射活性の割合を、転写活性とした。

成 績

I. Tax タンパクは転写活性化領域をもつ

酵母転写調節因子である GAL4 タンパクは DNA に直接結合するための DNA 結合領域と、転写活性化領域とを持つ。Tax タンパクが GAL4 タンパクの転写活性化領域の欠失を補うかを検討し、Tax タンパクが転写活性化領域を持つことの証明を試みた。すなわち GAL4 タンパクの DNA 結合領域と Tax タンパクとの融合タンパクが GAL4 タンパク結合配列依存性に転写を活性化しうかを検討した (図3)。

レポータープラスミドとしてまずアデノウイルスの Elb 遺伝子のプロモーターである TATA box の支配下に大腸菌由来 CAT 遺伝子を発現させるプラスミド pBCAT を構築した (図1)。GAL4 タンパク依存性の

転写を調べるために、GAL4 タンパク結合配列を、pBCAT のプロモーター上流に組み込んだ pG5BCAT を構築した (図1)。このようにして構築されたレポータープラスミドと種々の転写調節因子発現プラスミドを NIH3T3 細胞に遺伝子導入し、細胞内でのレポーター遺伝子の発現量を、CAT アッセイで測定した。

GAL4 タンパクの N 末端147アミノ酸残基 GAL (1-147) (図2) は、転写活性化領域を欠失しているが、DNA 結合能を保持している。従って GAL4 タンパクの DNA 結合領域である GAL (1-147) タンパクの発現ベクターをエフェクタープラスミドとし、pG5BCAT をレポータープラスミドとして共に NIH3T3 細胞に遺伝子導入しても、GAL4 タンパク結合配列依存性の転写活性化はみられなかった。一方 GAL (1-147) とヘルペスウイルス VP16 タンパクの転写活性化領域を含む C 末端78アミノ酸残基との融合タンパク GALVP (図2) は、GAL4 タンパク結合配列に依存して転写を活性化した。このことから GAL (1-147) がエンハンサーに対する特異性を保持しており、転写活性化領域が相補的に補われれば、GAL4 タンパク結合配列に依存した転写活性化能を回復することが確認された。Tax タンパクが転写活性化領域をもつかどうかを調べるため、GAL4 タンパクの DNA 結合領域と

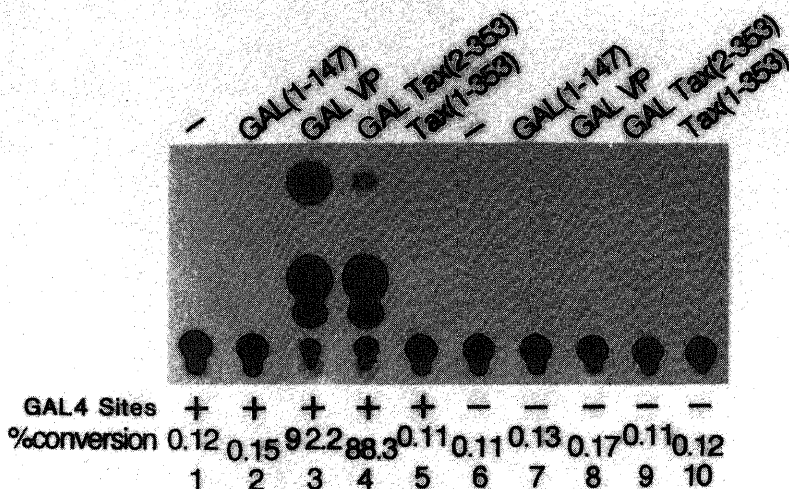


Fig. 3. Transcriptional activation of the CAT gene by hybrid proteins containing GAL4 DNA binding domain. pG5BCAT with GAL4 binding sites (lanes 1-5) and pBCAT without GAL4 binding sites (lanes 6-10) were used as reporter plasmids. Effector plasmids: lanes 1 & 6, no plasmids; lanes 2 & 7, GAL (1-147); lanes 3 & 8, GALVP; lanes 4 & 9, GALTax (2-353); lanes 5 & 10, Tax (1-353).

Tax タンパクとの融合タンパク GALTax の発現ベクターを構築した (図 2). 融合タンパク GALTax は GALVP と同様に, pG5BCAT の転写を活性化した. 一方レポータープラスミドとして GAL4 タンパク結合配列を持たない pBCAT を使用した場合には GALTax によって転写は活性化されなかった. これより GALTax による pG5BCAT の転写活性化は, GAL4 タンパク結合配列に特異的に起こる事が確認された. 一方本来の Tax タンパクは pG5BCAT の転写を活性化しないことから GALTax による pG5BCAT の転写活性化は, GAL4 タンパクの DNA 結合領域依存性であることが確認された.

以上の結果から Tax タンパクが転写調節因子の転写活性化領域を補う機能を持つことが示された.

II. 融合タンパク GALTax による GAL4 タンパク結合配列依存性の転写活性化に必要な Tax タンパクの領域

GAL4 タンパク結合配列依存性の転写活性化に必要な Tax タンパクの領域を同定するため, GALTax 発現プラスミドの Tax タンパクをコードする領域に, 欠失変異を導入し (図 2), これらの欠失変異体が,

GAL4 タンパク結合配列依存性の転写活性化能を持つかどうかを調べた (図 4).

Tax タンパクの N 末端側 9 アミノ酸を欠失した GALTax (10-353) は, GAL4 タンパク結合配列依存性の転写活性化能を喪失した. C 末端側 16 アミノ酸を欠失した GALTax (2-337) には, 欠失の影響はなかった. しかし C 末端側 41 アミノ酸を欠失した GALTax (2-312), 並びにアミノ酸 61 番から 171 番までを欠失した GALTax (Δ 61-171), アミノ酸 171 番から 285 番までを欠失した GALTax (Δ 171-285) はいずれも, GAL4 タンパク結合配列依存性の転写活性化能を喪失した.

つまり GALTax タンパクによる GAL4 タンパク結合配列を介した転写活性化には Tax タンパクのアミノ酸 2 番から 337 番までの領域, すなわち全体の 95% に相当する領域が必要であった.

III. HTLV-I 遺伝子の転写活性化に必要な Tax タンパクの領域

次に GAL4 タンパク結合配列依存性の転写活性化に必要な Tax タンパクの領域が, 本来の HTLV-I 遺伝子のエンハンサー (21塩基対の繰り返し配列) 依存

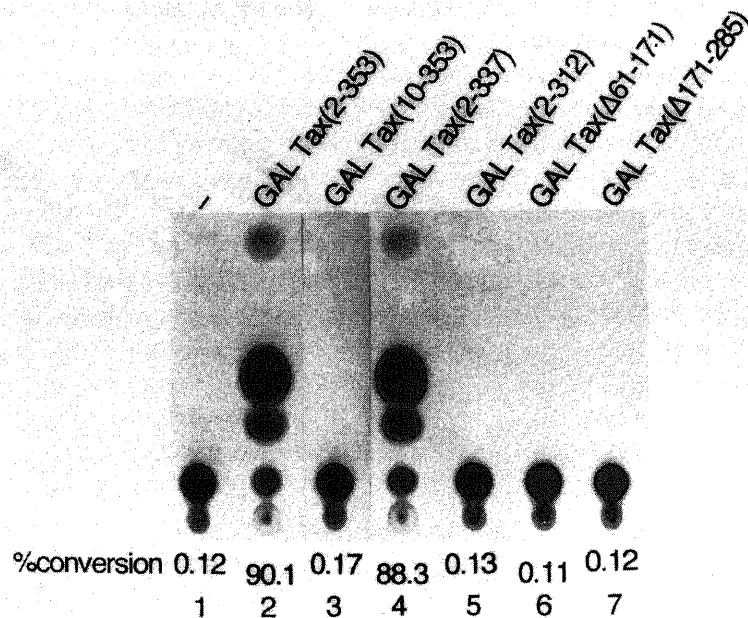


Fig. 4. Transcriptional activation of the CAT gene from the promoter carrying GAL4 binding sites by GAL4-Tax hybrids. PG5BCAT was used as reporter plasmid. Effector plasmids: lane 1, no plasmids; lane 2, GALTax (2-353); lane 3, GALTax (10-353); lane 4, GALTax (2-337); lane 5, GALTax (2-312); lane 6, GALTax (Δ 61-171); lane 7, GALTax (Δ 171-285).

性の転写活性化にも必要とされるかどうかを調べた (図5). レポータープラスミドとしては HTLV-I 遺伝子の Tax タンパク応答領域 (21塩基対の繰り返し配列) をもつ p21aCAT (図1) を用いた.

GALTax タンパクと GALTax (2-337) は HTLV-I エンハンサー依存性に転写を活性化した. しかし GALTax (10-353), GALTax (2-312), GALTax (Δ 61-171) および GALTax (Δ 171-285) は, HTLV-I エン

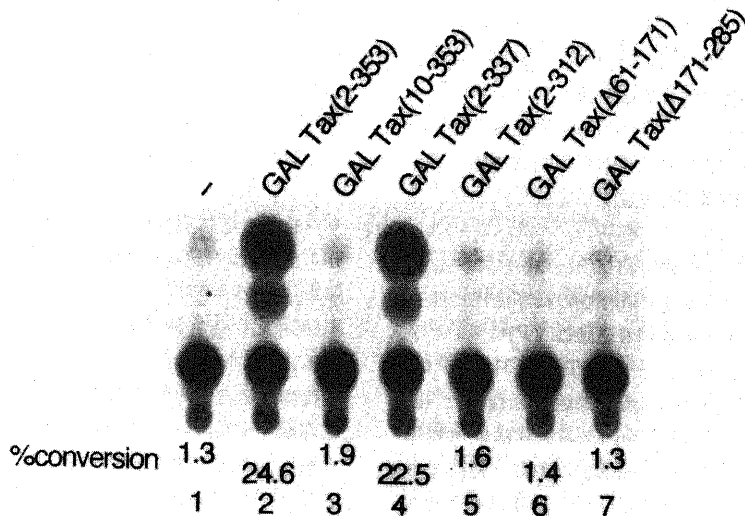


Fig. 5. Transcriptional activation of the CAT gene from the promoter carrying 21-bp repeat elements by GAL4-Tax hybrids. P21aCAT was used as reporter plasmid. Effector plasmids: lane 1, no plasmids; lane 2, GALTax (2-353); lane 3, GALTax (10-353); lane 4, GALTax (2-337); lane 5, GALTax (2-312); lane 6, GALTax (Δ 61-171); lane 7, GALTax (Δ 171-285).

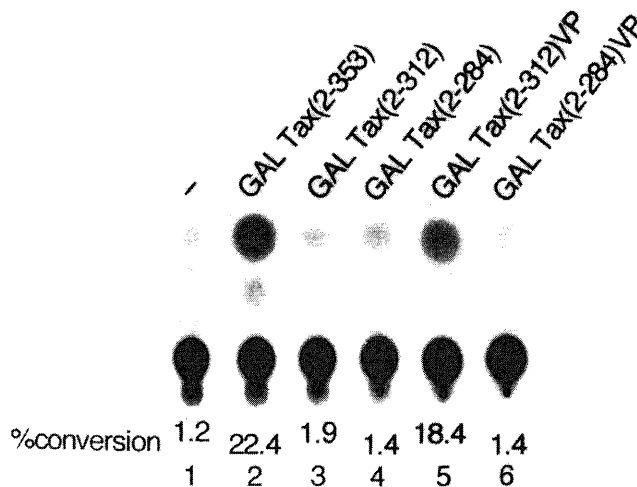


Fig. 6. Transcriptional activation of the CAT gene from the promoter carrying 21-bp repeat elements by GAL4-Tax-VP16 hybrids. P21aCAT was used as reporter plasmid. Effector plasmid: lane 1, no plasmids; lane 2, GALTax (2-353); lane 3, GALTax (2-312); lane 4, GALTax (2-284); lane 5, GALTax (2-312) VP; lane 6, GALTax (2-284) VP.

ハンサー依存性の転写活性化能を喪失した。

以上の結果より Tax タンパクのアミノ酸 2 番から 37 番までの領域が 21 塩基対依存性の転写活性化にも必要である事が明らかになった。これより GAL4 タンパク結合配列依存性の転写活性化能がウイルス遺伝子のトランス活性化作用に重要な役割を果たしている事が示唆された。

IV. Tax タンパクは HTLV-I エンハンサーに対する特異性を規定する領域を持つ

Tax タンパクが DNA と直接的あるいは間接的に結合する転写調節因子ならば転写活性化領域に加えて、21 塩基対に対する特異性を規定する領域を持つはずである。

Tax タンパクの C 末端側 41 アミノ酸を欠失した GALTax (2-312) は 21 塩基対依存性の転写活性化能を持っていない。しかしその C 末端側に VP16 タンパクの転写活性化領域を融合した GALTax (2-312) VP (図 2) は 21 塩基対依存性の転写活性化能を回復した (図 6)。この結果から VP16 タンパクの転写活性化領域が Tax タンパクの転写活性化領域の機能を置換できること、また欠失変異体 GALTax (2-312) は転写活性化能を失っても、21 塩基対に対する特異性は保持していることが明らかになった。しかし Tax タンパクの

C 末端側 69 アミノ酸を欠失した GALTax (2-284) (図 2) は C 末端側に VP16 タンパクの転写活性化領域を補っても、21 塩基対依存性の転写活性化能を回復しなかった (図 6)。

次に VP16 タンパクの転写活性化領域を融合させた欠失変異体について、これらが細胞内で正常に発現し、GAL4 タンパク結合配列依存性の転写活性化能を有していることの確認を行なった (図 7)。GALTax (2-312) VP および GALTax (2-284) VP は GAL4 タンパク結合配列依存性に転写を活性化し、転写活性化能を有することが確認された。

以上の結果より Tax タンパクの HTLV-I エンハンサーに対する特異性を規定する領域は、アミノ酸 2 番から 312 番の内部に存在することが示された。

考 察

本研究では、Tax タンパクが DNA に直接あるいは間接的に結合する転写調節因子に特徴的な機能である転写活性化領域および HTLV-I エンハンサーに対する特異性を規定する領域を持つことを示した。さらに Tax タンパクの転写活性化領域と HTLV-I 21 塩基対に対する特異性を規定する領域がそれぞれ異種の DNA 結合領域 (GAL4 タンパク) ならびに、転写活性

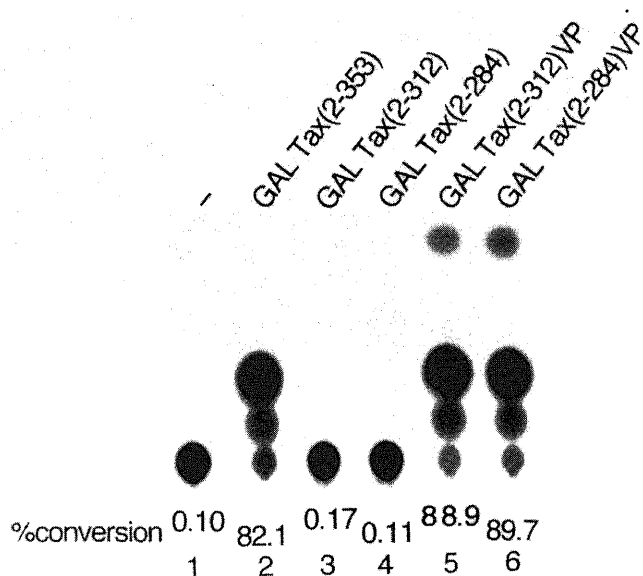


Fig. 7. Transcriptional activation of the CAT gene from the promoter carrying GAL4 binding sites by GAL4-Tax-VP16 hybrids. PG5BCAT was used as reporter plasmid. Effector plasmids: lane 1, no plasmids; lane 2, GALTax (2-353); lane 3, GALTax (2-312); lane 4, GALTax (2-284); lane 5, GALTax (2-312) VP; lane 6, GALTax (2-284) VP.

化領域 (VP16 タンパク) と協調的にはたらくことから、これらの二つの領域が互いに独立して機能し得ることを示した。以上より Tax タンパク自身は DNA 上のエンハンサーに直接的に結合する活性を持たないが、エンハンサー上で形成される DNA-タンパク複合体に組み込まれた状態で、おそらくは細胞性転写因子を介して DNA に結合し、近接するプロモーターからの転写を活性化すると考えられる。この場合、通常用いられている生化学的手法では Tax タンパクとエンハンサーとの結合は検出されない事より、複合体の親和性は低い事が推定される。

転写調節因子の転写活性化領域として、酸性アミノ酸に富んだ領域、グルタミンに富んだ領域、あるいはプロリンに富んだ領域などが知られている²⁴⁻²⁶。Tax タンパクの C 末端側にも、アミノ酸 323 番から 337 番にかけて酸性アミノ酸に富んだ領域がある (図 8)。また、この領域に欠失変異を導入すると GAL4 タンパク結合配列依存性の転写活性化能を失うことから (図 4)、この領域は転写活性化領域の一部として機能していることが示唆された。しかし Tax タンパクの N 末端側 9 アミノ酸を欠失した GALTax (10-353) は、この酸性アミノ酸に富んだ領域を含むにもかかわらず、GAL4 タンパク結合配列依存性の転写活性化能を持っていない (図 4)。従って Tax タンパクのアミノ酸 323 番から 337 番の酸性アミノ酸に富んだ領域は、単独では転写活性化領域としては作用できず、転写活性化領域の一部ではあるが独立して機能する VP16 タンパクの酸性アミノ酸に富む領域と同等ではないと考えられる。

これまでに種々の転写活性化因子の転写活性化領域が同定されているが、これらは通常 30 から 100 個のアミノ酸で構成されている²⁰。例えば、HTLV-I 関連ウイルスである、ウシ白血病ウイルス (bovine leukemia virus, BLV) の場合、転写活性化領域は約 40 個のアミノ酸によって規定されている²⁸。一方 Tax タンパクの転写活性化領域はアミノ酸 2 番から 337 番までにわたり、これは 353 アミノ酸からなる Tax タンパクのほぼ 95% に相当する。この結果は Smith らの報告²⁹とよく相関する。すなわち、彼らは Tax タンパクのアミノ酸

2 番から 337 番までの領域内の点変異体の多くが、21 塩基対の繰り返し配列依存性の転写活性化能を失うことを報告している。

Tax タンパクは 21 塩基に対する特異性を規定する領域を持つ。この領域は Tax タンパクが HTLV-I のエンハンサー上で形成される DNA-タンパク複合体に組み込まれるために必要な領域と考えられる。一方 Tax タンパクの 21 塩基対に対する結合活性は報告されていないので、上記の複合体の親和性は低い事が予想される。21 塩基対の繰り返し配列の一部は cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate (cAMP) 応答配列³⁰⁻³² や 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA) 応答配列³³⁻³⁶ と良く似ている。これらの応答配列に結合するタンパクも含めて、21 塩基対の繰り返し配列に結合する種々のタンパクが報告されているが³⁷⁻⁴²、Tax タンパクと結合するタンパクは現時点では同定されていない。Tax タンパクの転写活性化機構を明らかにするためには、今後このタンパクの同定が必要と考えられる。また Tax タンパクと 21 塩基対との相互作用が通常の生化学的手法で検出されないことから、Tax タンパクが直接 HTLV-I のエンハンサーに作用しない可能性、すなわち Tax タンパクが HTLV-I のエンハンサーに作用する細胞性タンパクを誘導することで、二次的にウイルスの転写を活性化する可能性についても、もう一度検討する必要がある。

結 論

HTLV-I 遺伝子の pX 領域にコードされる Tax タンパクの構造および転写活性化機構について以下の結論を得た。

1. Tax タンパクは転写活性化領域を持つ。
2. Tax タンパクによる転写活性化にはアミノ酸 2 番から 337 番までの広い領域を必要とする。
3. Tax タンパクの HTLV-I エンハンサーに対する特異性はアミノ酸 2 番から 312 番の内部に存在する領域によって規定される。
4. 以上の結果から Tax タンパクは修飾因子としてではなく転写調節因子として、エンハンサー上で形成される DNA-タンパク複合体に組み込まれた状態

301

310

320

330

340

350

SFHS L H L L F *EE* Y T N I P I S L L F N *EK* E A D D N D H E P Q I S P G G L E P G S *EK* H F R E T *EV*

Fig. 8. Amino acid sequence of Tax protein C-terminal region. Acidic amino acids are indicated by italic.

で近接するプロモーターからの転写を活性化すると考えられる。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜りました恩師松田保教授に深甚なる謝意を表します。また、終始直接のご指導を賜りました金沢大学がん研究所ウイルス部藤井雅寛博士および清木元治教授に深謝します。さらに多大なるご協力を賜りました金沢大学医学部第三内科学教室ならびに金沢大学がん研究所ウイルス部の皆様に感謝致します。

文 献

- 1) Poiesz, B. F., Ruscetti, F. W., Gazdar, A. F., Bunn, P. A., Minna, J. D. & Gallo, R. C.: Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 7415-7419 (1980).
- 2) Poiesz, B. F., Ruscetti, F. W., Reitz, M. S., Kalyanaraman, V. S. & Gallo, R. C.: Isolation of a new type C retrovirus (HTLV) in primary uncultured cells from a patient with Sezary T-cell leukemia. *Nature*, **284**, 268-271 (1981).
- 3) Yoshida, M., Miyoshi, I. & Hinuma, Y.: Isolation and characterization of retrovirus from cell lines of human adult T-cell leukemia and its implication in the disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 2031-2035 (1982).
- 4) Seiki, M., Hattori, S., Hirayama, Y. & Yoshida, M.: Human adult T-cell leukemia virus: Complete nucleotide sequence of the provirus genome integrated in leukemia cell DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 3618-3622 (1983).
- 5) Seiki, M., Eddy, R., Shows, B. T. & Yoshida, M.: Non specific integration of the HTLV provirus genome into adult T-cell leukemia cells. *Nature*, **309**, 640-642 (1982).
- 6) Sodroski, J. C., Rosen, C. A. & Haselsteine, W. A.: Transacting transcriptional activation of the long terminal repeat of human T lymphotropic viruses in infected cells. *Science*, **225**, 381-385 (1984).
- 7) Fujisawa, J. & Seiki, M.: Functional activation of the human T-cell leukemia virus type I by trans-acting factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 2277-2281 (1985).
- 8) Fujisawa, J., Seiki, M., Sato, M. & Yoshida, M.: A transcriptional enhancer sequence of HTLV-V-I is responsible for transactivation mediated by p40x of HTLV-I. *EMBO J.*, **4**, 713-718 (1986).
- 9) Shimotoono, K., Takano, M., Teruchi, T. & Miwa, M.: Requirement of multiple copies of a 21-nucleotide sequence in the U3 region of human T-cell leukemia virus type I and type II long terminal repeats for trans-acting activation of transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 8112-8116 (1986).
- 10) Inoue, J., Seiki, M., Taniguchi, T., Tsuru, S. & M., Yoshida.: Induction of interleukin 2 receptor gene expression by p40^x encoded by human T-cell leukemia virus type I. *EMBO J.*, **5**, 2883-2888 (1986).
- 11) Maruyama, M., Shibuya, H., Harada, H., Hataketama, M., Seiki, M., Fujita, T., Inoue, J., Yoshida, M. & Taniguchi, T.: Evidence for aberrant activation of the interleukin-2 autocrine loop by HTLV-I encoded p40x and T3/Ti complex triggering. *Cell*, **48**, 343-350 (1987).
- 12) Leung, K. & Nabel, G. J.: HTLV-I transactivator induces interleukin-2 receptor expression through an NF- κ B like factor. *Nature*, **333**, 776-778 (1988).
- 13) Fujii, M., Sassone-Corsi, P. & Verma, I. M.: c-fos promoter trans-activation by the tax protein of human T-cell leukemia virus type I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 8526-8530 (1988).
- 14) Miyatake, S., Seiki, M., Yoshida, M. & Arai, K.: T-cell activation signals and human T-cell leukemia virus type I-encoded p40x protein activate the mouse granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene through a common DNA element. *Mol. Cell. Biol.*, **8**, 5581-5587 (1988).
- 15) Jeang, K. T., Widen, S. G., Semmes, O. J. & Wilson, S. H.: HTLV-I trans-activator protein, Tax, is a trans-repressor of the human β -polymerase gene. *Science*, **247**, 1082-1084 (1990).
- 16) Jeang, K. T., Shank, R. P. & Kumar, A.: Transcriptional activation of homologous viral long terminal repeats by the human immunodeficiency virus type 1 or the human T-cell leukemia virus type-1 tat proteins occurs in the absence of *de novo* protein synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 8291-8295 (1988).

- 17) O'Hare, P. & Goding, C. R.: Herpes simplex virus regulatory elements and the immunoglobulin octamer domain bind a common factor and are both targets for virion transactivation. *Cell*, **52**, 435-445 (1988).
- 18) Thomas, G. & Robert, G. R.: A herpesvirus trans-acting protein interacts with transcription factor OTF-1 and other cellular proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 6347-6351 (1988).
- 19) Lillie, J. W. & Green, M. R.: Transcription activation by the adenovirus Ela protein. *Nature*, **338**, 39-44 (1989).
- 20) Jane, Y. W., Zhuo-Yuan, Z., Amrit, J., Christine A. C. & William, S. R.: The hepatitis B virus-encoded transcriptional trans-activator hbx appears to be a novel protein serine/threonine kinase. *Cell*, **63**, 687-695 (1990).
- 21) Ma, J. & Ptashne, M.: Deletion analysis of GAL4 defines two transcriptional activating segments. *Cell*, **48**, 847-853 (1987).
- 22) Kakidani, H. & Ptashne, M.: GAL4 activates gene expression in mammalian cells. *Cell*, **52**, 161-167 (1988).
- 23) Sadowski, H., Ma, J., Triezenberg, S. & Ptashne, M.: GAL4-VP16 is an unusually potent transcriptional activator. *Nature*, **335**, 563-564 (1988).
- 24) Ptashne, M.: How eukaryotic activators work. *Nature*, **335**, 683-689 (1988).
- 25) Mitchell, P. J. & Tjian, R.: Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science*, **245**, 371-378 (1989).
- 26) Ptashne, M. & Gann, A. F.: Activators and targets. *Nature*, **346**, 329-331 (1990).
- 27) Gorman, C. M., Moffat, L. F. & Howard, B. H.: Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.*, **2**, 1044-1051 (1982).
- 28) Luc, W., Richard, K. & Aresene B.: The amino acid (157-197) peptide segment of bovine leukemia virus p34^{tax} encompass a leucine-rich globally neutral activation domain. *Oncogene*, **6**, 159-163 (1991).
- 29) Smith, M. R. & Greene W. C.: Identification of HTLV-I tax transactivator mutants exhibiting novel transcriptional phenotypes. *Genes & Dev.*, **4**, 1875-1885 (1991).
- 30) Montminy, M. R., Sevarino, K., Wagner, J., Mandel, G. & Jay, G.: Identification of a cyclic-AMP-responsive element within the rat somatostatin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 6682-6686 (1986).
- 31) Tsukadda, T., Fink, J. S., Mandel, G. & Goodman, R. H.: Identification of a region in the human vasoactive intestinal polypeptide gene responsible for regulation by cyclic AMP. *J. Biol. Chem.*, **262**, 8743-8747 (1987).
- 32) Yamamoto, K., Gonzalez, G. A., Biggs, W. H. & Montminy, M. R.: Phosphorylation-induced binding and transcriptional efficacy of nuclear factor CREB. *Nature*, **334**, 494-498 (1988).
- 33) Imbra, R. & Karin, M.: Phorbol ester induces the transcriptional stimulatory activity of SV40 enhancer. *Nature*, **323**, 555-558 (1986).
- 34) Angel, P., Imagawa, M., Chiu, R., Stein, B., Imbra, R., Rahmador, H., Jonat, C., Herrlich, P. & Karin, M.: Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor. *Cell*, **49**, 729-739 (1987).
- 35) Chiu, R., Imagawa, M., Imbra, R., Bockoven, J. & Karin, M.: Multiple cis- and trans-acting elements mediate the transcriptional response to phorbol ester. *Nature*, **329**, 648-651 (1987).
- 36) Lee, W., Mitchell, P. & Tjian, R.: Purified transcription factor AP-1 interacts with TPA-inducible enhancer elements. *Cell*, **49**, 741-752 (1987).
- 37) Jeang, K., Boros, I., Brady, J., Radonovich, M. & Khoury, G.: Characterization of cellular factors that interact with the human T-cell leukemia virus type I p40^{tax}-responsive 21-base-pair sequence. *J. Virol.*, **62**, 4499-4509 (1988).
- 38) Tan, T., Horikoshi, M. & Roeder, R. G.: Purification and characterization of multiple nuclear factors that bind to the TAX-inducible enhancer within the human T-cell leukemia virus type 1 long terminal repeat. *Mol. Cell. Biol.*, **9**, 1733-1745 (1989).
- 39) Yoshimura, T., Fujisawa, J. & Yoshida, M.: Multiple cDNA clones encoding nuclear proteins that bind to the tax-dependent enhancer of HTLV-1: all contain a leucine zipper structure and basic amino acid domain. *EMBO J.*, **9**, 2537-2542

(1990).

- 40) Montagne, J., Beraud, C., Crenon, I., Lambard-Platet, G., Gazzolo, L., Sergeant, A. & Jalinot, P.: Tax1 induction of the HTLV-I 21 bp enhancer requires cooperation between two cellular DNA-binding proteins. *EMBO J.*, **9**, 957-964 (1990).
- 41) Nyborg, J. K., Dynan, W. S., Chen, I. S. Y. & Wachsman, W.: Binding of host-cell factors of

human T-cell leukemia virus type I: implications for viral gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 1457-1461 (1988).

- 42) Nyborg, J. K. & Dynan, W. S.: Interaction of cellular proteins with the human T-cell leukemia virus type I transcriptional control region: purification of cellular proteins that bind the 21-base pair repeat elements. *J. Biol. Chem.*, **265**, 8230-8236 (1990).

Structural and Functional Analysis of Human T-cell Leukemia Virus type-I (HTLV-I) Tax protein Haruo Tsuchiya, Department of Internal Medicine (III), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med Soc., **100**, 744—756 (1991)

Key words HTLV- I , tax, transcription factor, activation domain, enhancer specificity

Abstract

Tax protein encoded by the pX region of human T-cell leukemia virus type- I (HTLV- I) genome activates HTLV- I gene expression at a transcriptional level, dependent on 21 base pair (bp) repeats within the long terminal repeat (LTR). Difficulties in detecting any association of Tax with the viral enhancer have hampered elucidation of the molecular mechanism of Tax-mediated transcriptional activation. By constructing a fusion protein with the heterologous DNA binding domain of yeast GAL4, Tax was shown to be a potent transcriptional activator dependent on the presence of GAL4 binding sites. Deletions of the Tax portion of the fusion protein revealed that almost the entire region of Tax (amino acid 2-337) was required for the activation, and the activity correlated well to that for the viral enhancer. The GALTax mutant lacking 41 residues of the C-terminus of Tax, GALTax (2-312), was inactive for the viral enhancer, but recovered activity with the addition of the heterologous activation domain of herpes simplex virus VP16. These results suggest that Tax has two distinct but overlapping functional domains for transcriptional activation and for enhancer specificity. Thus, Tax is thought to be a transcription factor acting in the enhancer complex rather than a catalytic or allosteric modifier of pre-existing transcription factors.